

OLÉAGINEUX

Revue générale des corps gras et dérivés



CHROMATOGRAPHIE DU CAROTÈNE DE L'HUILE DE PALME

par **M^{lle} Irmentraut LÖW**

DR. PHIL. NAT., HEIDELBERG

et **M^{lle} Simone ARGOUD**

CHIMISTE A L'I.R.H.O.

Sur notre demande, M. le Professeur KUHN, auquel nous adressons tous nos remerciements, a bien voulu accepter de détacher dans nos laboratoires, son Assistante au Kaiser Wilhelm Institut, à Heidelberg. Pendant quelques mois, Mlle Löw, avec l'aide de Mlle ARGOUD, a étudié la chromatographie de concentrés caroténés préparés dans les laboratoires de l'I.R.H.O., les uns par distillation des esters méthyliques de l'huile de palme, par M. SERVANT, et les autres, par saponification de ces mêmes esters, par M. CUVIER. Les déterminations spectrophotométriques ont été effectuées à l'I.R.H.O. par MM. SERVANT et BESSUAND.

Après un rappel du mode de préparation de ces extraits, et un exposé général de la méthode chromatographique, Mlle Löw résume ses expériences dont on peut tirer comme premières conclusions la présence de trois carotènes isomères et de lycopène, ainsi que la formation, au cours du traitement, de proportions plus ou moins importantes de stéréoisomères, en particulier de pseudo- α -carotène. Ce dernier pigment se trouve dans certaines huiles provenant de Côte d'Ivoire. La structure du carotène serait modifiée, vraisemblablement au cours de l'extraction de l'huile, puisque les fruits ne contiennent que l'isomère entièrement trans.

Pendant l'hiver 1949-1950, nous avons procédé dans les laboratoires de l'I.R.H.O., ainsi que dans un laboratoire particulier, à des essais de chromatographie de concentrés caroténés obtenus par divers procédés. Cette étude avait deux objets principaux :

1° la mise au point d'un procédé de cristallisation pratique du β carotène pur, dont nous avons besoin pour des essais de préparation de vitamine A, par scission in-vitro ;

2° la détermination de la proportion des différents isomères et stéréoisomères du carotène présents dans les extraits après traitement de l'huile, soit par distillation dans le vide des esters méthyliques obtenus par méthanolyse alcaline, soit par saponification de ces mêmes esters.

* *

L'huile de palme initiale provenait de la plantation de l'I.R.H.O. à Grand-Drewin (Côte d'Ivoire). Cette huile a été séparée sans neutralisation préalable en deux fractions, l'une solide, l'autre liquide, suivant la technique décrite par M. LOURY dans « Oléagineux » N° 4, 1947. L'huile liquide ainsi obtenue avait une acidité inférieure à 2,5 % calculée en acide oléique libre et fut soumise directement à la méthanolyse.

Pour cela, il suffit d'agiter pendant deux heures à la température ordinaire un mélange de 5 kgs de cette fraction liquide et de 2,2 litres d'alcool méthylique pur, contenant en solution 125 gr. de potasse. Par décantation, on sépare une couche contenant un mélange de glycérine et de savon avec de l'alcool méthylique. Par lavages répétés à l'eau tiède, on obtient des esters débarrassés de savon et d'alcool.

Pour 100 kgs d'huile liquide, on obtient 90 kgs 5 d'esters qui contiennent la presque totalité des pigments colorés. La détermination de la richesse en carotènes totaux, au spectrophotomètre Beckmann, donne une teneur de 1,66 % dans l'ester.

Dans le but de préparer des concentrés caroténés, ces esters fortement colorés en rouge, ont été traités dans les laboratoires de deux façons différentes :

1° Par distillation dans le vide.

On se sert d'une marmite en acier inoxydable, chauffée au bain d'huile contenant 4 kgs d'esters. Un vide égal ou inférieur au 1/100 de mm. de mercure est obtenu par une pompe à palette et une pompe à vapeur de mercure. Dans ces conditions, la vitesse de distillation est de 600 gr. à l'heure, la température maximum du bain d'huile étant de 150° et celle d'ébullition 132°. On obtient d'une part, des esters très peu colorés et un résidu de distillation contenant le carotène.

La durée de la distillation, et par conséquent du chauffage est d'environ 6 heures. La teneur des concentrés en caroténoïdes varie de 5,6 % (conc. II) à 10,5 (conc. IV).

2° Par saponification des esters méthyliques.

L'indice de saponification étant voisin de 200, la quantité de soude pure à employer est de 14,3 % du poids des esters. Pratiquement on emploie 17 %.

Dans un saponificateur muni d'un agitateur et d'un réfrigérant ascendant-descendant, on dissout 340 gr. de paillettes de soude dans 1,5 litre de méthanol et on ajoute 200 gr. d'esters méthyliques aux environs de 60°C. La saponification est terminée en 1/2 heure à

1 heure environ, le réfrigérant fonctionnant en reflux. On élimine alors l'alcool sous un vide de 15-20 cm. en utilisant le réfrigérant descendant. En 3-4 heures, on a un savon pulvérulent très sec.

Le savon sec est alors épuisé à l'aide d'un solvant chloré : dichloréthane ou chlorure de méthylène. On casse ensuite le solvant dans le vide (dans le cas du dichloréthane). Quand la solution est ramenée à 50 cc., on filtre sur Buchner pour éliminer les impuretés (en particulier les savons solides) et on finit la concentration sous vide, avec rentrée d'azote au bain-marie.

On obtient ainsi des concentrés titrant environ 15% de carotène. Nous pouvons dire dès maintenant que les dosages biologiques, sur rats d'expérience carencés en vitamine A, ont généralement confirmé les déterminations spectrophotométriques des teneurs en carotène.

Nous exposons en détail ces résultats dans ce numéro d'« Oléagineux ».

Ce sont donc ces deux sortes de concentrés, définis par les esters D (distillation) et S (saponification) qui ont servi de matières premières aux études chromatographiques.

CHROMATOGRAPHIE

a) Solvants employés.

- Ether de pétrole 35-50°, fractionné avec une colonne Vigreux.
- Benzène cristallisable, rectifié pour éliminer les têtes et l'eau.
- Mélange éther de pétrole-benzène, 3/1 en volume, utilisé pour les développements des chromatogrammes.
- Méthanol, Ethanol purs.
- CHCl_3 utilisé pour les mesures spectrophotométriques.

b) Adsorbants.

Nous avons utilisé au début de l'oxyde de magnésium Westvaco mélangé conformément aux indications de Strain, J. Biol. Chem., 1934, t. 105, n° 3, p. 523-535, avec de l'Hyflo-Super-Cel 1/1 et desséché pendant une nuit à 80°.

c) Mode opératoire.

Le remplissage des tubes à chromatographie s'opère à sec au moyen d'une légère aspiration. Le vide étant maintenu, on verse la solution dans l'éther de pétrole des carotènes à étudier. Puis on lave avec le même volume d'éther de pétrole, et enfin on développe avec une quantité suffisante du mélange éther de pétrole-benzène 3/1.

Pour l'éluat, les colonnes sont complètement desséchées sous vide ; la zone à étudier est alors ôtée de la colonne à l'aide d'une spatule et versée immédiatement dans un becher avec de l'éther de pétrole

contenant 1-2 % de méthanol. On verse dans un nouveau tube la totalité du mélange. Le solvant est filtré sous vide et l'adsorbant lavé à l'éther de pétrole-méthanol jusqu'à décoloration complète. Le filtrat coloré est alors mis dans une ampoule à décanter, lavé 3-4 fois avec de l'eau, pour éliminer l'alcool, desséché sur $\text{SO}_4 \text{Na}_2$, et filtré. L'extrait anhydre est évaporé à sec sous vide, sous atmosphère d'azote, au bain-marie à 40-50°. Le résidu est alors mis à cristalliser dans de l'éther de pétrole ou dans un mélange benzène-méthanol.

d) Applications.

A) Concentrés D.

1° On dissout 33 gr. d'un concentré I à 6% de carotène, — soit 2 gr. — dans 200 cc. d'éther de pétrole. On fait passer 100 cc. sur une colonne de $22,5 \times 5,5$ remplie du mélange magnésie-hyflo-supercel

Le chromatogramme (Fig. 1) est développé avec 100 cc. d'éther de pétrole-benzène 3/1. La colonne est desséchée par aspiration. On isole la zone α et β -carotène et ses constituants en sont séparés par une deuxième chromatographie.

On lave, sèche et ramène l'éluat à 350 cc.

La teneur en carotène, calculée en β -carotène, au spectrophotomètre est de 4,6 mg. par cc., soit 1,6 gr. pour les 350 cc.

Le spectre d'absorption fournit deux maxima à 456 et 485 $\text{m}\mu$ (CHCl_3), alors que le β carotène pur les présente à 466 et 497, l' α -carotène à 454 et 485, et le pseudo- α -carotène à 456 et 486, avec un « cis-peak »

à 340 (cf. courbe 1). Il s'agit donc d'un mélange (le pseudo- α -carotène (KARRER) est identique au néo- β -carotène B. de Zechmeister).

L'éluat est évaporé à sec et le résidu mis à cristalliser dans un mélange benzène-méthanol. Après lavage et séchage, on obtient 435 mg. de cristaux de β carotène, soit 22% de la teneur totale du concentré.

En ajoutant du méthanol à la liqueur mère, on obtient une huile rouge foncé qu'il est impossible de faire cristalliser.

La même opération recommencée sur 41,2 gr. d'un concentré II à 5,6% de carotènes totaux, a donné 440 mg. de β carotène cristallisé soit 17,5% du carotène total.

Les cristaux ont été recristallisés plusieurs fois dans le mélange benzène-méthanol et présentent au

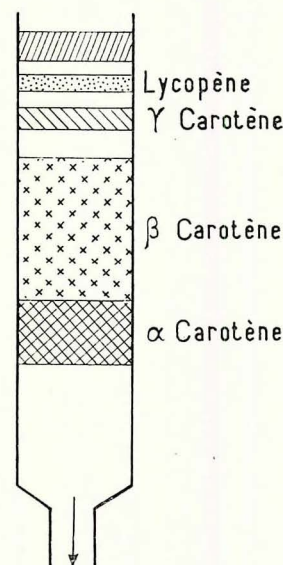


Fig. 1. — Séparation des caroténoïdes de l'huile de palme en solution dans l'éther de pétrole sur une colonne de magnésie.

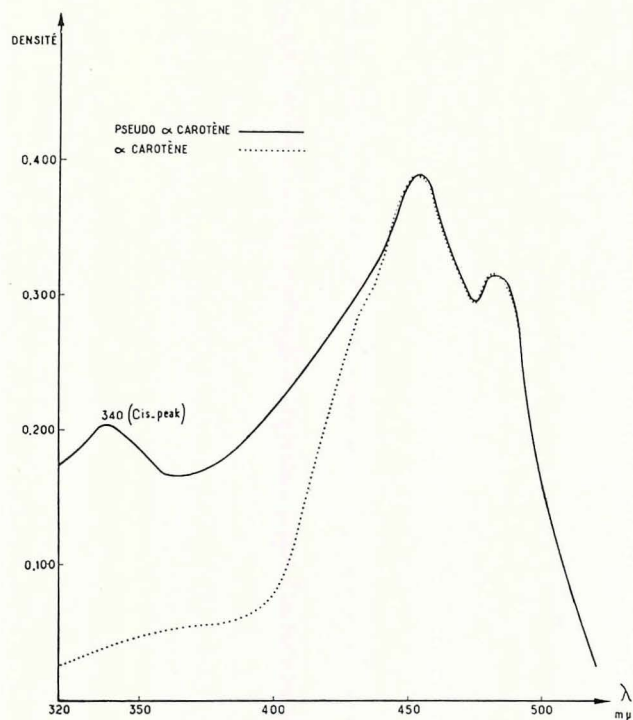


Fig. 2. — Courbe 1 : Spectre d'absorption de pseudo α carotène et d' α carotène dans le chloroforme.

Beckmann deux maxima à 465 et 490 m μ , ce qui correspond à peu près au spectre du β carotène pur (cf. courbe 2) (il s'agit en réalité du β carotène souillé par un peu de dérivé α et de traces de γ et de lycopène).

2° Les concentrés N° III et IV (39 gr. à 8,1% de carotène, soit 3,2 gr. et 26 gr. à 10,5% soit 2,75 gr.) sont respectivement traités par 100 cc. d'éther de pétrole et laissés au repos. Au bout d'une semaine, les précipités, constitués par un mélange de carotène cristallisé et de glycérides incolores, sont filtrés, lavés avec le mélange éther de pétrole-méthanol et desséchés. On obtient respectivement 530 mg. et 750 mg., soit respectivement 16, 27% du carotène total. Après recristallisation, le produit présente un spectre voisin de celui du β carotène, maximums à 465 et 490 m μ (CHCl₃).

Un chromatogramme de contrôle a démontré que les cristaux sont constitués par du β carotène mélangé d'un peu d' α et de traces de γ et de lycopène. Les zones colorées étaient nettement séparées entre elles par des zones incolores, ce qui n'était pas le cas du chromatogramme des concentrés.

Après séparation de cette première fraction de cristaux, chacun des deux concentrés III et IV a été chromatographié sur une colonne de 20 \times 5 de magnésie-hyflusupercel et développé par le mélange éther de pétrole-benzène 3/1.

Les zones d' α et de β carotène sont éluées, rassemblées, lavées et séchées sur SO₄ Na₂, et ramenées dans le vide sous azote à 40 cc. Les cristaux formés sont filtrés, lavés à l'éther de pétrole méthanol et séchés. On sépare ainsi 100 mg. d'un mélange de β et d' α carotène.

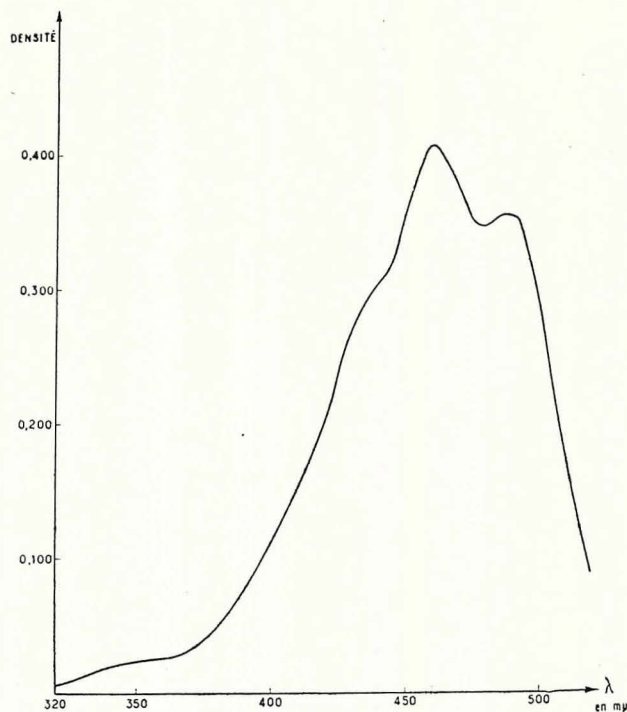


Fig. 3. — Courbe 2 : Spectre d'absorption de β carotène contenant un peu d' α carotène et des traces de γ carotène et lycopène dans le chloroforme.

Les eaux mères sont alors évaporées à sec et le résidu huileux rouge foncé est traité par le mélange benzène-méthanol. Un essai de cristallisation ne donne aucun résultat. L'huile visqueuse est alors reprise par 100 cc. d'éther de pétrole, la solution lavée à l'eau et séchée.

Au Beckmann, on obtient un spectre avec deux maxima à 456 et 486 m μ et un Cis-peak à 340, ce qui correspond au pseudo- α -carotène (cf. courbe 1). On sait que lors de cette transformation des caroténoïdes trans, la courbe spectroscopique présente des altérations. En particulier, ainsi que nous l'avons constaté, un nouveau maximum apparaît dans l'ultra-violet, alors que la courbe était auparavant aplatie. C'est ce qu'on appelle le « Cis-Peak effect ».

50 cc. de cette solution ci-dessus dans l'éther de pétrole sont à nouveau chromatographiés sur une colonne I de 20 \times 5. Par développement, les zones colorées se trouvent étalées sur toute la hauteur de la colonne. A la partie inférieure se trouve, nettement visible, la zone jaune de l' α carotène, et immédiatement au-dessus une zone rouge foncé de β carotène (ordinairement orange). On développe de façon à faire passer dans le filtrat toute la zone d' α carotène et la partie inférieure de la zone β .

Ce filtrat est alors développé à nouveau sur une colonne II de 20 \times 5 afin d'obtenir des zones colorées nettement partagées sur toute la hauteur de la colonne. Cependant, malgré un développement très poussé avec une quantité importante de solvant, on n'obtient pas de séparation de la zone β carotène.

Pour déterminer le spectre d'absorption, on divise les deux colonnes (I) et (II) en tranches de la façon suivante, et on les élue.

1^o Fraction principale de la colonne (I) facilement éluable. Maxima 340, 455, 480 m μ (CHCl₃).

2^o Reste de la colonne (I) difficilement éluable. Maxima 340, 455, 480 m μ .

3^o 2/3 de la partie supérieure de la colonne (II). Maxima 340, 453, 480 m μ .

4^o Bord inférieur rouge foncé de la colonne (II). Maxima 340, 455, 480 m μ .

5^o Zone d' α carotène de la colonne (II). Maxima 455, 480 m μ .

A titre de comparaison, on détermine le spectre d'adsorption des cristaux ($\alpha + \beta + \gamma$ carotène + lycopène). Maxima 463, 491 m μ .

On voit donc que toutes ces zones ne donnent pas le spectre du β carotène, mais celui du pseudo- α -carotène avec le « cis-peak » à 340 m μ .

Il en résulte donc que les concentrés D, préparés comme décrit ci-dessus, contiennent des quantités importantes de β carotène stéréoisomérisé, sous forme de pseudo- α -carotène, tel qu'il a été décrit par KARRER et JUCKER (« Die Carotinoide », Bâle, 1948, p. 153).

Des essais pour séparer le β carotène de pseudo- α -carotène sur alumine Brockmann et sur chaux éteinte n'ont donné aucun résultat.

B) Concentrés S.

Les concentrés S sont le plus souvent beaucoup plus riches en carotène que les concentrés D. Aussi cristallisent-ils spontanément. Deux concentrés V et VI — 5,4 g. à 8,8 % de carotène soit 0,475 g. et 2,9 g. à 15,5 %, soit 0,450 g. ont été respectivement traités de la manière suivante.

Le concentré étant dilué avec de l'éther de pétrole, les cristaux sont filtrés et recristallisés dans du benzène-méthanol. Après lavage et séchage, un chromatogramme d'essais montre que les cristaux sont constitués par un mélange de beaucoup de β carotène, à côté d'un peu d' α et de très peu de lycopène. Les zones colorées du chromatogramme sont très nettes et séparées par des zones intermédiaires incolores.

Après séparation des premiers cristaux représentant 35 % du carotène total, le concentré dissous dans l'éther de pétrole est adsorbé sur une colonne de 22 x 5,5 de magnésie-hyflosuperpel. Le chromatogramme est développé avec 100 cc. d'éther de pétrole, puis avec 400 cc. du mélange éther de pétrole-benzène 3/1. Après élution de la zone β carotène, lavage, séchage et évaporation de l'éluat sous vide, on obtient 6 % de carotène cristallisé.

On sépare ainsi environ 40 % du carotène total.

Les eaux mères d'éther de pétrole sont à nouveau chromatographiées et la zone β carotène est élue.

Le spectre d'adsorption donne les maxima à 452-455 m μ et 480 (CHCl₃), avec un « cis-peak » à 340. Donc, encore, dans ce cas, les isomères cis du β carotène, pseudo- α -carotène, restent dans les eaux-mères.

A partir du 1^{er} Janvier 1950, nous avons traité des concentrés préparés à partir d'une huile de palme de même origine, mais prélevée sur un lot récemment arrivé de la colonie.

Deux essais de saponification ont été faits à partir de cette huile. Ils ont permis d'obtenir respectivement 35 et 40 % du carotène total, sous forme de β carotène. Les liqueurs mères, réunies, sont lavées à l'eau, séchées et évaporées à faible volume. On obtient à nouveau des cristaux de β carotène, représentant environ 7-8 %. Maxima 465, 490 m μ .

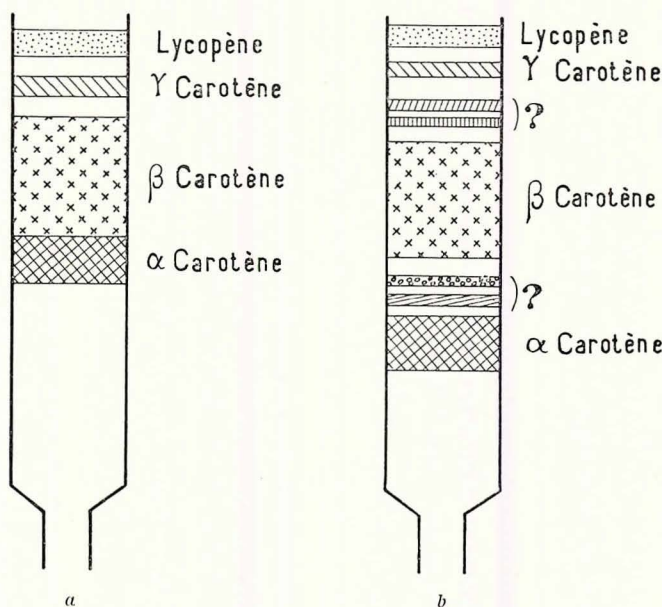


Fig. 4. — Chromatogramme de caroténoïdes de l'huile de palme :
a) lot 1949 ;
b) lot 1950.

Une comparaison des chromatogrammes antérieur et postérieur au 1^{er} Janvier 1950, c'est-à-dire correspondant aux deux lots d'huile de palme étudiés, a montré que, dans le cas du 2^e lot, deux nouvelles zones très nettes se présentaient entre l' α et le β carotène, et au moins deux nouvelles autres zones entre le β et le γ carotène.

La composition en caroténoïdes des huiles de palme de 1949 et 1950 semble donc notablement différente. Nous étudierons plus tard la composition de ces sous-zones, qui correspondent sans doute à des produits d'isomérisation, cette transposition ayant eu lieu dans l'huile avant traitement, peut-être au cours de l'extraction à partir des fruits.

CONCLUSION

	Date	Poids de concentré	Teneur en caroténoïdes totaux	Poids du carotène cristallisé mgr.	soit : % des caroténoïdes totaux
		gr.	% gr.		
A. — Traitement des concentrés D					
I	29/11/1949	33	6,1 = 2,0	435	22
II	21/11/1949	41,2	5,6 = 2,5	410	17,5
III	1/12/1949	39,8	8,1 = 3,2	530	16,5
IV	2/12/1949	26	10,5 = 2,7	750	28
B. — Traitement des concentrés S					
V	20/1/1950	5,4	8,8 = 0,475	200	42
VI	24/1/1950	2,9	15,5 = 0,450	220	49

RÉSUMÉ

Ce début de l'examen chromatographique des pigments caroténoïdes de l'huile de palme permet, d'ores et déjà, de tirer certaines conclusions.

1° Il confirme les études déjà faites, en particulier par HUNTER et SCOTT (Biochem J., 35, 31, 1941), démontrant l'existence de 4 caroténoïdes principaux, le β carotène, les α et γ carotène, et le lycopène, le premier se trouvant en quantité prédominante, et les deux derniers en très faible proportion.

2° Sous l'influence de certains traitements, le β carotène s'isomérise. D'après les travaux de

ZECHMEISTER, on sait que le β -carotène naturel est constitué par le dérivé entièrement trans. Sous l'influence de la chaleur, en particulier, le produit se transforme artificiellement en dérivé cis. Le di-cis- β -carotène est généralement dénommé pseudo- α -carotène. Ce phénomène d'isomérisation est d'ailleurs réversible, la forme trans étant plus stable.

Il apparaît donc que la distillation des esters doit être menée avec beaucoup de précaution et le plus rapidement possible. Dans le cas du procédé par saponification, non seulement cette opération, mais surtout l'élimination du dichloréthane employé comme solvant, doit se faire à une température aussi basse que possible.

3° La formation de stéréoisomères peut expliquer les divergences que nous avons pu rencontrer au cours des analyses biologiques, étant entendu que les résultats obtenus au cours de ces analyses ne peuvent jamais être considérés avec la même rigueur qu'une détermination physique ou chimique.

4° Il existe des variations dans la composition de l'huile de palme de même provenance, dues sans doute à la présence d'isomères formés au cours de l'extraction de l'huile à partir des fruits. Il ne faut pas oublier en effet que l'huile est soumise alors, pendant plusieurs heures, à l'air à des températures relativement élevées de l'ordre de 110-120°, suffisantes pour expliquer l'isomérisation partielle.

5° En prenant des précautions, ou en modifiant le mode opératoire, on peut arriver à diminuer notablement ce phénomène, et augmenter d'autant le rendement en cristaux de β et d' α -carotène.

CONGRÈS DE CHIMIE

Du 17 au 23 Septembre s'est tenu à Milan le XXIII^e congrès de chimie industrielle organisé par la Société de Chimie Industrielle, 28 rue Saint-Dominique à Paris. En même temps se célébrait dans la même ville le VI^e congrès national italien de chimie pure et appliquée, organisé par la Société Chimique Italienne. Le congrès était divisé en vingt sections, l'une d'elle traitera des matières grasses et dérivés, une autre des essences et parfums, une troisième de chimie agricole, une quatrième de chimie alimentaire, etc...

Du 19 au 26 Octobre s'est tenue en Espagne, à Saragosse, la sixième réunion biennale de la Société Royale Espagnole de Physique et Chimie et la troisième réunion des Instituts de Physique et Chimie du Conseil Supérieur des Recherches Scientifiques Espagnoles. En même temps a eu lieu dans l'enceinte de la Foire Nationale des échantillons, une

exposition scientifique à laquelle ont pris part toutes les régions d'Espagne.

C'est en Grande-Bretagne que se tiendra en 1952, le congrès international de chimie analytique. Lors de la conférence de l'Union Internationale de chimie pure et appliquée tenue au mois de Septembre 1949, il a été décidé de former six sections autonomes dont celle de chimie analytique. On envisage de faire coïncider la réunion de cette section avec la tenue du congrès précité.

Une Exposition générale de Matériel de Laboratoire et d'Appareils de Contrôle industriel, organisée sous les auspices de la Société de Chimie Industrielle par « Chimie analytique », revue mensuelle des Laboratoires, aura lieu du 18 au 1950 à la Maison de la Chimie, 28, rue Saint-Dominique, Inv. 24 Novembre 10-73.